



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/31, C07K 14/26, A61K 39/108, 39/155, 39/385, 31/715	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/14415 (43) Date de publication internationale: 17 mai 1996 (17.05.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01463 (22) Date de dépôt international: 7 novembre 1995 (07.11.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/13306 7 novembre 1994 (07.11.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PIERRE FABRE MEDICAMENT [FR/FR]; 45, place Abel-Gance, F-92100 Boulogne (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BINZ, Hans [CH/FR]; Les Crêtes, F-74160 Beaumont (FR). BAUSSANT, Thierry [FR/FR]; 35, rue Jean-Jaurès, F-01200 Bellegarde (FR). HAEUW, Jean-François [FR/FR]; La Rose-des-Vents, 2, place de la Libération, F-74160 Saint-Julien-en-Genevois (FR). NGUYEN NGOC, Thien [FR/FR]; 7, Les Petits-Hutin-Lathoy, F-74160 Saint-Julien-en-Genevois (FR). (74) Mandataire: MARTIN, Jean-Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: CARRIER PROTEIN HAVING AN ADJUVANT EFFECT, IMMUNOGENIC COMPLEX CONTAINING SAME, PREPARATION METHOD THEREFOR, NUCLEOTIDE SEQUENCE AND VACCINE		
(54) Titre: PROTEINE PORTEUSE A EFFET ADJUVANT, COMPLEXE IMMUNOGENE LA CONTENANT, LEUR PROCEDE DE PREPARATION, SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE ET VACCIN		
(57) Abstract <p>An adjuvant product for enhancing the activity of a molecule on delivery to a host, characterised in that it includes at least a portion of <i>Klebsiella pneumoniae</i> protein P40 or a protein at least 80 % homologous thereto. Nucleotide sequences coding for such peptides or proteins, and the use of said sequences as a drug, are also disclosed. Such DNA sequences may particularly be used in intramuscular or intradermal immunisation compositions.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne un produit adjuvant destiné à améliorer l'activité d'une molécule lors de l'administration à un hôte, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une partie de la protéine P40 de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ou une protéine présentant au moins 80 % d'homologie avec la protéine P40 de <i>Klebsiella pneumoniae</i>. L'invention a également pour objet les séquences nucléotidiques codant pour ces peptides ou protéines et l'utilisation de ces séquences à titre de médicament. Plus particulièrement, de telles séquences d'ADN peuvent être utilisées dans des compositions destinées à l'immunisation par voie intramusculaire ou intradermale.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

PROTEINE PORTEUSE A EFFET ADJUVANT, COMPLEXE IMMUNOGENE LA
CONTENANT, LEUR PROCEDE DE PREPARATION, SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE ET
VACCIN.

La présente invention concerne des adjuvants destinés à être
5 associés à une molécule pour améliorer son activité, en particulier pour
augmenter l'intensité de la réponse immunitaire. Elle concerne également
des complexes contenant un tel adjuvant associé à une molécule active.

La molécule active peut notamment être une protéine, un peptide,
un polysaccharide, un oligosaccharide ou un acide nucléique, ADN ou ARN.

10 La mise au point de vaccins parfaitement définis et dépourvus
d'effets secondaires marqués, nécessite l'emploi d'antigènes vaccinaux de
faible masse moléculaire, tels que des peptides ou des oligosaccharides. Ces
antigènes de faible masse, mais aussi certains antigènes de masse
moléculaire supérieure tels que les polysaccharides de la paroi
15 bactérienne, ne peuvent induire seuls une réponse immunitaire durable
et intense. Il est indispensable de lier ces antigènes, par voie chimique ou
par génie génétique, à des protéines porteuses.

Les protéines porteuses, actuellement utilisées, sont de deux types :

- les anatoxines tétanique et diphtérique : l'emploi trop fréquent de ces
20 protéines porteuses risque d'aller à l'encontre d'une réponse intense
contre l'haptène et risque de poser des problèmes d'immunotoxicologie,
- un extrait de protéine membranaire de *Neisseria meningitidis* (OMPC) :
est constitué par une protéine membranaire contaminée par des lipides
et des LPS.

25 Le brevet EP- 267 204 a proposé l'utilisation d'une molécule de
support destinée à être couplée à un immunogène, et consistant en une
protéine de membrane d'*E. coli* ou de *Salmonella*.

La Demanderesse a démontré qu'une protéine extraite de la
membrane externe de *Klebsiella pneumoniae* permet d'améliorer
30 considérablement la réponse immunitaire à un antigène ou un haptène
lorsqu'elle est administrée en même temps que celui-ci à un hôte. Plus
particulièrement, une protéine OmpA, la protéine P40 de *K. pneumoniae*,
peut être utilisée comme adjuvant dans des complexes immunogènes, où
elle est associée à un élément immunogène.

Les conjugués chimiques issus d'un couplage de peptides à la P40 donnent de bons résultats, et une évaluation de la réponse immunitaire montre des réponses en anticorps contre ces peptides supérieures à celles observées en utilisant les protéines porteuses de référence, KLH ou TT.

5 Toutefois, les antigènes peptidiques sont greffés de manière préférentielle sur la partie C-terminale de la séquence, partie de la molécule la plus immunogène, (Puohiniemi, R et al., 1990, Infect Immun. 58, 1691-1696. Ceci peut poser un problème sérieux pour les protéines de fusion contenant la séquence complète de P40. Ainsi, l'utilisation d'un
10 fragment de la séquence supportant l'activité adjuvante, minimiserait davantage l'immunogénicité de la protéine porteuse et les risques liés à cette immunogénicité.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un complexe immunogène du type comprenant un élément immunogène, associé à un
15 adjuvant augmentant l'intensité de la réponse immunitaire, caractérisé en ce que l'élément immunogène est un antigène ou un haptène, et en ce que l'adjuvant comprend au moins une partie de la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae* ou une protéine présentant au moins 80% d'homologie et de préférence au moins 90% d'homologie avec la protéine P40.

20 En particulier, l'invention a pour objet un adjuvant constitué d'une protéine ou d'un peptide présentant la séquence de P40 substantiellement dépourvue des parties immunogènes.

Ces fragments de P40 selon l'invention sont notamment :

- 25 - la séquence de P40 dépourvue de la partie C terminale pérисplasmatiche immunogène,
- une séquence contenant la 3ème et la 4ème boucle extramembranaire flanquant une séquence intramembranaire,
- une séquence contenant une boucle extramembranaire invariable et la séquence intramembranaire adjacente.

30 On définit comme boucles extramembranaires invariables les séquences de P40 homologues avec les séquences des boucles conservées entre différentes espèces d'entérobactéries. Les séquences des boucles extramembranaires non conservées au cours de l'évolution sont dénommées boucles variables. La localisation des boucles
35 extramembranaires est réalisée d'après le modèle de VOGEL et JAHNIG (1986, J. Mol. Biol., 190 : 191-199) concernant l'OmpA d' *E. coli*.

Le choix des fragments et plus particulièrement la troisième séquence (acides aminés 127 à 179) est fondé sur l'hypothèse selon laquelle les boucles extramembranaires invariables (conservées entre les OmpA des différentes entérobactéries) contiennent des séquences reconnues par des cellules immunocompétentes, ces dernières pouvant posséder des récepteurs reconnaissant ces séquences.

La reconnaissance spécifique de ces séquences par des cellules présentatrices d'antigènes permettrait de cibler des antigènes vers ces cellules et ainsi d'induire un effet adjuvant.

C'est pourquoi, l'un des objets de l'invention est un produit adjuvant qui consiste en la séquence comprise entre les amino-acides 1 à 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae*, ou une séquence présentant au moins 80% et de préférence au moins 90% d'homologie avec la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 1 et 179 de la séquence de la protéine P40 de *K. pneumoniae*.

Un autre objet de l'invention est un adjuvant qui consiste en la séquence comprise entre les amino-acides 108 à 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae* ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie et de préférence au moins 90% d'homologie avec la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 108 et 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae*.

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet un adjuvant qui consiste en la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 127 à 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae* ou une séquence présentant au moins 80% et de préférence au moins 90% d'homologie avec la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 127 à 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae*.

Les séquences ID n° 2, ID n° 4, ID n° 6 et ID n° 8 correspondent à des adjuvants selon l'invention. Cette protéine et ces peptides adjuvants peuvent notamment être préparés à partir de membranes de bactéries du genre *Klebsiella pneumoniae*. Le procédé comprend alors les étapes suivantes :

- a) précipitation des lipopolysaccharides par addition de détergent et d'un sel de cation divalent et récupération du surnageant,
- b) précipitation des protéines du surnageant et remise en suspension du culot,
- 5 c) chromatographie de la suspension sur échangeur d'anions et récupération des fractions contenant le produit adjuvant,
- d) chromatographie sur échangeur de cations et récupération de la fraction contenant le produit adjuvant,
- 10 e) concentration de la fraction obtenue à l'issue de l'étape d) pour récupérer un produit adjuvant sous forme de protéine ou de peptide, essentiellement dépourvu de liposaccharides.

Des étapes de dialyse peuvent avantageusement intervenir entre, respectivement, les étapes b) et c) et les étapes c) et d).

- 15 L'invention a également pour objet les complexes immunogènes pouvant être obtenus à partir des différents adjuvants.

L'adjuvant peut être associé à l'élément immunogène par couplage chimique.

- 20 Ce couplage covalent de l'haptène peptidique à l'adjuvant peut être effectué d'une façon bien connue dans la technique. Des réactifs appropriés à cette fin comprennent notamment les esters de N-succinimide, les carbodiimides, l'EEDQ (N-éthoxycarbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoléine) et similaires.

On peut également fusionner par génie génétique le fragment de la protéine P40 en cause et l'élément immunogène.

- 25 La protéine de fusion obtenue entre le fragment de la protéine 40 et l'élément immunogène peut également être fusionnée, par génie génétique à une protéine qui est un récepteur à une protéine sérique, en particulier à la sérumalbumine humaine.

- 30 L'élément immunogène, un antigène ou haptène, peut notamment provenir de virus ; on peut citer les protéines du RSV (Virus Respiratoire Syncytial) ou leurs fragments, par exemple la protéine G du RSV, ou l'antigène de l'hépatite B.

- 35 Dans le cas de la protéine G du RSV, on peut utiliser la protéine totale ou ses fragments, éventuellement modifiés par mutagenèse ponctuelle ou délétion.

La Demanderesse a montré que l'administration d'un haptène couplé à un fragment de la protéine P40 selon l'invention entraînait une augmentation substantielle de la réponse immunitaire, en limitant les risques de réactions à l'encontre de l'adjuvant lui-même.

5 Un procédé pour augmenter l'immunogénicité d'un antigène ou d'un haptène, caractérisé en ce qu'on associe ledit antigène ou haptène à un adjuvant qui comprend tout ou partie de la séquence de la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae*, sous forme d'un complexe tel que défini précédemment fait également partie de l'invention.

10 L'invention a donc également pour objet un vaccin, caractérisé en ce qu'il contient un élément immunogène associé à un fragment de la protéine P40 dépourvu d'une partie substantielle de la séquence C-terminale de la protéine P40 native.

Elle comprend également des compositions pharmaceutiques
15 contenant un complexe formé entre un adjuvant et un élément immunogène, tel que défini précédemment et des excipients pharmaceutiquement acceptables adaptés à son administration par voie parentérale et/ou orale.

L'invention a également pour objet les séquences nucléotidiques
20 codant pour les peptides ou les protéines décrits précédemment, et l'utilisation de ces séquences à titre de médicament. Plus particulièrement, de telles séquences d'ADN peuvent être utilisées dans des compositions destinées à l'immunisation par voie intramusculaire ou intradermale.

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans
25 aucunement en limiter la portée.

Dans ces exemples, on se référera aux figures suivantes :

Figure 1 : Stratégie de clonage par amplification génique de P40.

Figure 2 : Clonage de P40 dans pVABBG2ΔC.

30 Figure 3 : Choix des différents fragments de P40.

Figure 4 : Clonage de ΔP40G2ΔC dans pVABB

Figure 5 : Réponse anticorps anti-peptidique G1ΔC après des immunisations avec différentes concentrations de P40ext-G1ΔC.

Figure 6 : Réponse anticorps anti-peptidique G1ΔC obtenue avec différents schémas d'immunisation.

Exemple 1 : Isolement et purification de la protéine p40

5

Matériel et méthodes

La biomasse de *Klebsiella pneumoniae* (souche I-145, 40 g de cellules sèches) est ajustée à pH 2,5 à l'aide d'acide acétique pur.

10 Après addition de 1/2 volume d'une solution contenant 6% cétrimide, 60% éthanol, 1,5 M CaCl_2 dont le pH est ajusté à 2,5 avec de l'acide acétique, le mélange est placé sous agitation pendant 16 heures à température ambiante.

15 Après centrifugation 20 mn à 15000 g à 4° C, les protéines du surnageant sont précipitées à l'éthanol. Deux précipitations successives avec centrifugation intermédiaire (10 mn, 10000 g, 4° C) sont réalisées : de 20 à 50 % puis de 50 à 80%.

Les culots obtenus après la seconde précipitation sont remis en suspension dans une solution de zwittergent 3-14, 1%.

20 Après agitation 4 heures à température ambiante, le pH est ajusté à 6,5 à l'aide de NaOH 1N.

Une centrifugation du mélange pendant 20 mn à 10000 g à 4° C permet d'obtenir une fraction enrichie en protéines membranaires (fraction MP).

25 Les protéines de la fraction MP sont dialysées contre un tampon Tris/HCl 20 mM pH 8,0 ; zwittergent 3-14, 0,1%. Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur d'anions forts (colonne de Ø = 50 mm x H = 250 mm, gel Biorad Macrorep High Q) équilibrée dans le tampon décrit ci-dessus. La protéine P40 est éluée pour
30 une concentration de 50 mM en NaCl dans le tampon d'équilibration.

Les fractions contenant la P40 sont rassemblées et dialysées contre un tampon citrate 20 mM pH 3,0 ; zwittergent 3-14, 0,1%. Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur de cations forts (dimensions de la colonne : Ø = 25 mm x H = 160 mm, gel Biorad

Macroprep High S) équilibrée dans le tampon citrate 20 mM pH 3,0, zwittergent 3-14, 0,1 %. La protéine P40 est éluée pour une concentration 0,7 M en NaCl. Les fractions contenant la P40 sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration à l'aide d'un système de filtration à flux tangentiel Minitan Millipore utilisé avec des plaques de membranes possédant un seuil de coupure 10 kDa.

Résultats

Les fractions obtenues après chaque étape chromatographique sont analysées par SDS-PAGE afin de rassembler celles contenant la protéine P40.

Les quantités de protéines sont mesurées par la méthode de Lowry (tableau 1).

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des quantités de protéine et LPS des fractions obtenues pour les différentes étapes du procédé de purification de la protéine P40 (n.d. = non déterminé)

	Protéines	Rendement	LPS
Biomasse	40 g	-	n.d.
Fraction MP	900 mg	2,25 %	n.d.
Fraction enrichie en P40	400 mg	1 %	10 %
Protéine P40	130 mg	0,3 %	< 1%

La pureté et l'homogénéité de la protéine P40 sont estimées par SDS-PAGE.

5 Après l'étape de chromatographie d'échange de cations, la protéine P40 est dépourvue du contaminant majeur présent dans la fraction MP (la protéine présentant une masse moléculaire apparente de 18 kDa) et présente un degré de pureté supérieur à 95%. D'autre part, cette étape de purification permet l'élimination des lipopolysaccharides. Cette étape de purification n'existait pas dans le procédé de purification précédemment présenté.

10 Le profil électrophorétique de la P40 révèle plusieurs bandes. Ces bandes sont reconnues après immunoblot par des anticorps monoclonaux anti-P40 obtenus chez la souris. La bande majeure supérieure correspond à la protéine dénaturée (par le traitement à 100 ° C, 15 min. en présence de SDS), et la bande mineure inférieure à la protéine sous sa forme native.

15 La P40 est en effet une protéine dite modifiable par la chaleur (heat-modifiable), et cette propriété a été vérifiée à l'aide d'une cinétique de chauffage à 100° C en présence de SDS. Sans chauffage la protéine sous forme native présente une structure en feuillets β qui fixe plus de SDS et migre donc plus loin vers l'anode que la forme dénaturée (dénaturation complète après 5 min. à 100 ° C) qui présente une structure en hélices α (KELLER, K. B. 1978, J. Bacteriol., 134, 1181-1183).

20 La contamination par les lipopolysaccharides (LPS) est estimée par dosage par chromatographie en phase gazeuse de l'acide β -hydroxymyristique, acide gras marqueur des LPS de *Klebsiella pneumoniae* (tableau 1).

Cette méthode ne peut être utilisée que pour approcher la teneur en LPS des échantillons issus des différentes étapes de purification.

25 La quantité d'acide β -hydroxymyristique présente dans la fraction P40 après chromatographie d'échange de cations étant inférieure au seuil de quantification du dosage, on peut estimer que la quantité de LPS résiduel est inférieure à 1%.

Exemple 2 : Clonage et expression de la protéine P40

72% de la séquence du gène de l'OmpA de *Klebsiella pneumoniae* a été publié par LAWRENCE et al, 1991, J. Gen. Microbiol., 137 : 1911-1921).

5 L'originalité de nos travaux réside dans la détermination de la totalité de la séquence, soit celle correspondant aux 83 acides aminés N-terminaux et aux 11 acides aminés C-terminaux (sur un total de 335 acides aminés).

10 Matériel et méthode**Souches bactériennes**

15 * E. coli : RV 308 : souche ATCC 31608 (Maurer, R. et al., 1980, J. Mol. Biol., 139, 147-161).

* K. pneumoniae : IP 145 : souche C.I.B.P.F - Brevet d'invention déposé le 19 janvier 1981.

20 Vecteurs

* pRIT 28 (Hultman T. et al., 1988, Nucléosides Nucléotides, 7 : 629-638) : vecteur de clonage et de séquençage possédant le gène de résistance à l'ampicilline, les origines de réplication d'E. coli et du phage F1 ainsi
25 qu'une portion du gène lac-Z d'E. coli (β -galactosidase).

* pVABB : vecteur d'expression de fusion de gène.

Solutions

30

*** Amplification génique**

Tampon de lyse : 25 mM Taps pH 9,3
2 mM MgCl₂

35

10

Tampon d'amplification : 25 mM Taps pH 9,3
 2 mM MgCl₂
 Tween 20 0,1 %
 200 mM dNTP.

5

* Purification des protéines

10

TST (20X) : Tris base 0,5 M
 HCl 0,3 M
 NaCl 4 M
 Tween 20 1%
 EDTA 20 mM

15

Tampon de lavage : Tris HCl 50 mM pH 8,5
 MgCl₂ 5 mM

20

Solution de dénaturation : Gua-HCl 7,8 M
 Tris-HCl 28 mM pH 8,5
 Solution de renaturation : Gua-HCl 0,5 M
 Tris-HCl 25 mM pH 8,5
 NaCl 150 mM
 Tween 20 0,05 %.

25

Synthèse des oligonucléotides

30

Les amorces nucléotidiques ont été déterminées à partir de la partie de la séquence publiée de l'OMPA de *Klebsiella pneumoniae* (Lawrence, J.G. et al., 1991, J. Gen. Microbiol., 137: 1911-1921) de la séquence consensus issue de l'alignement des séquences de 5 OMPA d'entérobactéries (*E. coli*, *S. typhimurium*, *S. marcescens*, *S. dysenteriae*, *E. aerogenosae*), ainsi que des séquences de peptides obtenus par séquençage manuel.

Les oligonucléotides ont été synthétisés selon la méthode chimique des phosphoramidites sur l'appareil "Gene Assembler Plus" de Pharmacia.

Amplification génique par PCR du gène P40

5

L'ADN de l'OMPA de *Klebsiella pneumoniae* a été amplifié de la manière suivante.

Une colonie de *Klebsiella pneumoniae* est lysée dans 10 µl de tampon de lyse par chauffage à 95° C pendant 5 minutes.

10 1 µl de cette solution sert de source d'ADN pour les réactions d'amplification.

Celles-ci sont réalisées dans 100 µl de tampon d'amplification, avec 5 pmoles de chaque amorce et une unité d'enzyme Taq polymérase (Perkin Elmer Cetus). Chaque cycle comprend une étape de dénaturation de 30
15 secondes à 95° C suivie d'une hybridation de l'amorce à l'ADN et d'une extension d'une minute à 72° C. 30 cycles sont ainsi effectués à l'aide d'un thermocycleur "Gen Amp PCR" 9000 Perkin Elmer Cetus.

Les PCR suivantes sont réalisées à partir des fragments d'ADN amplifiés précédemment.

20 Les fragments d'ADN amplifiés sont ensuite digérés et liés au vecteur pRIT 28.

Séquençage

25 Les fragments ainsi clonés sont séquencés sur un séquenceur automatique 373. DNA Séquenceur d'Applied Biosystem. Les réactions de séquençage sont réalisées à l'aide du kit "dye Terminator" selon les recommandations du fournisseur (Applied Biosystem) soit sur de l'ADN double brin obtenu après amplification génique ou issu de maxiprep soit
30 sur de l'ADN simple brin issu de fragments PCR dénaturés (Hultman, T. et al, 1989, Nucleid Acids Rev. 17 : 4937-4946).

Expression de la protéine

Le gène entier de P40 est cloné dans le vecteur d'expression pVABB. Ce vecteur permet d'adjoindre une queue d'affinité "BB" à P40 ; B étant la
5 partie de la protéine G du streptocoque qui lie la serumalbumine (Nygren, P.A. et al, 1988, J. Mol. Recognit. 1, 69-74).

Les souches d'E. coli RV308 transformées par le vecteur pVABBP40 sont mises à cultiver une nuit à 37° C sous agitation, dans 100 ml de TSB complémenté en extrait de levure, en ampicilline (200 µg/ml) en
10 tétracycline (8 µg/ml) et en tryptophane (100 µg/ml). Le lendemain, une culture à D0 = 1 pour une longueur d'onde de 580 nm est préparée dans du TSB + extraits de levure + ampi + tetra.

Après 10 minutes de culture, l'expression de la protéine est induite par addition d'IAA à (25 µg/ml) dans le milieu. La culture est centrifugée à
15 4° C à 2460 g pendant 10 minutes.

Le culot est repris par 20 ml de TST 1 x pH 7,4, et la solution est alors centrifugée à 4° C à 23000 g pendant 30 minutes.

Le surnageant est passé sur HSA Sépharose ce qui permet d'isoler les protéines dites solubles. Le culot est lavé avec du tampon de lavage puis
20 centrifugé à 23000 g à 4° C pendant 30 minutes. Le culot renfermant les corps d'inclusion est alors repris par 900 µl d'une solution dénaturante + 100 µl de Dithiothreitol 10 mM et incubé 2 heures à 37° C.

La solution est ensuite incubée 1 nuit à température ambiante, sous agitation, dans 100 ml de tampon de renaturation puis centrifugée à 23 000
25 g à 4°C pendant 30 minutes.

Le surnageant est passé sur HSA Sépharose.

Dans les deux cas les protéines fixées sont éluées avec de l'acide acétique 0,5 M pH 2,8 et collectées par fraction de 1 ml.

Les fractions collectées sont ensuite analysées sur gel
30 d'électrophorèse en SDS-PAGE et par Immuno blot.

Résultats

Le clonage du gène a été effectué en trois temps selon la stratégie
35 présentée sur la figure 1.

Dans un premier temps, nous avons confirmé la partie de la séquence publiée à l'exception d'un T à la place d'un A en position 103.

Puis nous avons déterminé la séquence en 3' du gène et enfin celle en 5'.

5 Le gène entier a été obtenu par fusion des deux parties 8/4 et 3/14 puis cloné dans le vecteur pRIT 28. La séquence est la séquence id n° 1.

La protéine est exprimée sous la forme BBP40.

Elle est essentiellement obtenue à partir des corps d'inclusion. Pour une culture de 200 ml, on purifie une quinzaine de milligrammes de
10 protéine.

Le profil électrophorétique montre que BBP40, obtenue après dénaturation, est d'une grande pureté. Le poids moléculaire apparent, correspond au poids théorique calculé qui est de 63 kDa.

La caractérisation en Immuno blot montre que la protéine purifiée
15 est bien reconnue par un sérum de lapin anti-P40.

Exemple 3 : Protéine de fusion BBP40G2ΔC, sous groupe a

Un oligonucléotide correspondant à la partie N Terminale déletée-du
20 codon stop du gène, a été synthétisé.

La partie en 5' a été amplifiée par PCR, purifiée, clonée dans le vecteur pRIT 28 et séquencée, selon la méthodologie décrite dans l'exemple 2.

Dans un deuxième temps, les deux parties du gène ont été fusionnées
25 et clonées dans le vecteur pVABBG2ΔC (figure n° 2). G2ΔC représente la séquence d'un fragment de 101 amino-acides de la protéine G du virus respiratoire syncytial G (130-230).

Des bactéries E. coli de la souche RV308 sont ensuite transformées avec le vecteur PVABBG2ΔC.

30 Les protéines produites sont purifiées comme déjà décrit pour BBP40.

Résultats

La protéine BBP40G2 Δ C est essentiellement obtenue à partir des corps d'inclusion. On purifie une douzaine de mg de protéines à partir de
5 200 ml de milieu de culture.

En électrophorèse, la protéine est assez pure.

La masse moléculaire apparente correspond à la masse théorique calculée qui est de 75 kDa.

10 Exemple 4 : Clonage et expression de trois fragments de P40

Matériel et méthodes

Les oligonucléotides

15

Trois oligonucléotides complémentaires de la séquence de P40 ont été synthétisés : 16-17-18 (cf. figure 3).

Des parties du gène déterminées ont ensuite été amplifiées en PCR à partir de l'ADN d'une miniprep (protocole Applied) de pRIT 28 P40.

20

On a ainsi pu cloner la partie du gène correspondant à la totalité de la partie transmembranaire (8/17, baptisé fragment n° 8) à deux boucles externes-deux portions transmembranaires (16/17, baptisé fragment n°16) et 1 boucle externe deux portions transmembranaires (18/17, baptisé fragment n° 18).

25

Les fragments d'ADN ainsi amplifiés sont digérés puis isolés et ligués au vecteur pRIT 28 et séquencés (cf. BBP40 clonage de P40).

La protéine de fusion BB Δ P40G2 Δ C

30

Le gène G2 Δ C est digéré à partir du vecteur pRIT 28 G2 Δ C puis ligué au vecteur digéré pRIT 28 Δ P40 (Δ P40 représente un des fragments de P40).

Ensuite, l'ensemble Δ P40G2 Δ C est digéré et cloné dans pVABB (cf. figure 4).

Les trois protéines hybrides sont exprimées selon le protocole décrit pour BBP40.

Résultats

5

Tout comme BBP40 et BBP40G2ΔC, BB8G2ΔC est obtenu essentiellement à partir des corps d'inclusion. Une culture de 400 ml donne une dizaine de mg de protéines.

Par contre, les protéines BB18G2ΔC, et BB16G2ΔC se retrouvent majoritairement à l'étape de sonication, sous forme soluble. Dans les deux cas, on obtient une dizaine de mg/400 ml de culture.

Ces protéines ont été caractérisées en électrophorèse SDS-PAGE. Leur masse moléculaire correspond à la masse théorique calculée :

	BB8G2ΔC	58,03 kDa
15	BB16G2ΔC	46,5 kDa
	BB18G2ΔC	45,5 kDa

Les trois hybrides sont reconnus aussi bien par un anticorps polyclonal anti- G2 qu'anti P40 en Western Blot.

20 Exemple 5

1. Effets de la protéine P40 sur des cellules du système immunitaire

25 1.a. Lymphocytes B

On a injecté par voie sous-cutanée à des souris BALB/c (5 par groupe) aux jours 0 et 21, 30 µg de P40 obtenus par extraction de la membrane (P40 ext) ou par recombinaison génétique (P40 rec, c'est-à-dire BBP40). Les immunisations ont été effectuées sans aucun adjuvant. 10 jours après la dernière immunisation, la réponse en anticorps anti-P40ext a été évaluée sur les sérums individuels par la méthode ELISA. Le tableau 2 donne la moyenne des titres obtenus sur 5 échantillons. Les contrôles négatifs ne contenaient pas d'anticorps anti-P40ext.

35

Tableau 2 : réponse anticorps anti-P40ext

5	Immunisations avec:	xtP40	recP40
	Titres d'anticorps :	87040	112640

10 Dans ces conditions expérimentales, la P40rec est aussi immunogène que la P40ext. Ces deux protéines contiennent donc des épitopes B qui interagissent avec les lymphocytes B.

1.b. Lymphocytes T

15 La réaction d'hypersensibilité retardée (HSR) à la P40ext a été mesurée par le test du gonflement différé du coussinet. Des souris BALB/c (5 par groupe) ont été sensibilisées par voie sous-cutanée avec 100 µg de P40ext sans le moindre adjuvant. Après 6 à 10 jours, les souris ont été stimulées par voie sous-cutanée avec 100 µg de P40ext/20 µl dans le
20 coussinet postérieur droit, alors que le coussinet postérieur gauche recevait du PBS. 24 heures plus tard, le gonflement du coussinet a été mesuré. On n'observe pas d'hypersensibilité retardée dans le contrôle négatif (5 souris non sensibilisées).

25 Tableau 3 : réaction d'hypersensibilité retardée induite par P40ext, mesurée par le gonflement du coussinet (en mm)

30	J6		J10	
	BALB/c	C57B1/6	BALB/c	C57B1/6
	7,9	7,8	7,5	7,4

Les résultats montrés dans le tableau 3 indiquent que les souris immunisées avec P40ext produisent des réactions d'hypersensibilité retardée hautement quantitatives dans le coussinet. La réaction HSR reflète la réponse immunitaire à médiation cellulaire, nécessitant des cellules Th1. On peut en conclure que P40 ext contient au moins un épitope T qui est capable de favoriser la réponse Th1, sans restriction MHC.

1.3. Macrophages

L'effet de P40ext sur des macrophages a été déterminé par leur production de nitrite. Des cellules RAW 264,7, qui sont des monocytes-macrophages de souris, ont été incubées 72 heures à 37° C en présence de différentes concentrations de P40ext. La quantité de nitrites dans le surnageant des cultures cellulaires a été mesurée par un dosage colorimétrique avec le réactif de Griess-Ilosvay.

La production de nitrite reflète l'activation des macrophages, et joue un rôle crucial dans l'activité anti-microbienne et anti-tumorale de ces cellules. Les données obtenues montrent que P40ext stimule la production de nitrite des cellules RAW 264,7, démontrant que P40ext active les macrophages.

2. P40 est un porteur à effet adjuvant pour un peptide (G1ΔC)

2.1. Comparaison de P40ext avec d'autres supports

Le peptide utilisé est G1ΔC, un peptide obtenu à partir de la protéine G du RSV : (G174-187 ΔC) Trudel et al., 1991, J. Virol. 185: 749-757.

Cinétique de la réponse immunitaire contre G1 ΔC

Des souris C57Bl/6 (5 par groupe) sont immunisées avec G1 ΔC sous différentes formes selon un schéma d'immunisation identique. Les réponses anticorps induites par les différentes formes de G1 ΔC sont comparées dans le temps : 7, 17, 28, 35, 42 jours après le début de l'expérience.

La réponse anti-G1 Δ C est significativement plus élevée et plus rapide lorsque les souris sont immunisées avec P40/G1 Δ C que les immunisations plus classiques TT/G1 Δ C et KLH/G1 Δ C+AF. Une seule injection de P40/G1 Δ C permet d'obtenir, en 7 jours, un titre d'anticorps anti-G1 Δ C de 1000. Ce titre est obtenu avec TT/G1 Δ C+AF en 28 jours. La réponse maximum (titre = 1/380000), obtenue après trois injections, en 28 jours, est environ 30 fois supérieure à celle obtenue avec KLH/G1 Δ C +AF et 70 fois supérieure à celle obtenue avec TT/G1 Δ C. Le titre en anticorps anti-G1 se maintient sans faiblir jusqu'au jour 42.

10

Conclusion

Le couplage chimique du peptide G1 Δ C sur la protéine P40 a permis d'induire une réponse anti-G1 Δ C aussi importante que les modèles de référence KLH/G1 Δ C+AF ou TT/G1 Δ C.

15

Les résultats obtenus montrent que P40ext est une molécule porteuse à effet adjuvant pour G1 Δ C : P40ext est meilleure que la toxine tétanique et aussi bonne que l'association KLH + adjuvant de Freund.

2.1. Distribution isotypique des anticorps anti-peptide G1 Δ C

20

Les isotypes des sérums obtenus pendant les expériences décrites ci-dessus ont été déterminés par ELISA. Le tableau 4 présente la moyenne des valeurs de A450 de 5 sérums individuels testés à la dilution 1/250.

25

Tableau 4 : distribution isotypique des anticorps anti-peptide G1 Δ C

30

	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
A450 (dil.1/250)	2,892	1,212	2,970	0,209

35

On a montré que la sécrétion d'isotype d'anticorps est régulée par des sous-ensembles de cellules Th spécifiques d'un antigène qui peuvent être divisés en deux sous-ensembles Th1 et Th2. Les clones Th1 produisent de l'Il-2 et IFN-gamma, et des lymphotoxines, alors que les clones Th2 produisent de l'Il-4 et de l'Il-5. Les clones de Th1 et de Th2 induisent spécifiquement la sécrétion par les cellules B spécifiques d'un antigène, respectivement d'IgG2a + IgG3 et d'IgG1 + IgG2b + IgE. Les données présentées dans le tableau 4 montrent que IgG1 et IgG2b sont les deux isotypes majeurs des anticorps anti G1ΔC, l'IgG2a étant également représenté. On peut en conclure que chez les souris C57B1/6, P40-G1ΔC provoque une réponse Th2 supérieure à la réponse Th1.

2.2. Etude dose-effet

On a injecté par voie sous-cutanée à des souris BALB/c (5 par groupe) différentes concentrations de P40ext-G1ΔC, aux jours 0, 10 et 21. Une semaine après la dernière immunisation, des échantillons de sang sont prélevés et la réponse anticorps anti-peptide G1ΔC est estimée sur les sérums individuels par ELISA. La moyenne des titres de 5 échantillons est effectuée.

La figure 5 montre le rapport dose-effet de P40ext-G1ΔC. Une réponse anticorps anti-peptide G1ΔC est obtenue avec 1 µg de P40ext-G1ΔC. Les titres en anticorps les plus élevés sont observés avec 10 à 50 µg de P40ext-G1ΔC.

2.4. Détermination du schéma d'immunisation optimale

On a injecté par voie sous-cutanée à des souris BALB/c (5 par groupe) P40ext-G1ΔC (équivalent à 10 µg de G1 ΔC) aux jours indiqués sur la figure 6. La réponse anticorps anti-peptide G1ΔC est déterminée sur les sérums individuels par ELISA. 4 schémas d'immunisations ont été testés : une injection, deux injections aux jours 0 et 14, ou aux jours 0 et 21, et trois injections aux jours 0, 21 et 40. La réponse anticorps anti-peptide anti-G1ΔC la plus élevée est obtenue avec trois injections.

3. P40ext est un adjuvant efficace pour un antigène protéique (BBG2ΔC)

On a injecté par voie sous-cutanée à des souris BALB/c (5 par groupe) BBG2ΔC conjugué chimiquement à P40ext (équivalent à 10 μg de G2 ΔC) aux jours 0 et 21. Dix jours plus tard, la réponse anticorps anti-G2ΔC est déterminée dans les sérums individuels par ELISA. Les moyennes des titres de 5 échantillons sont données dans le tableau 5. Le contrôle négatif ne contenait pas d'anticorps anti-G2ΔC.

10

Tableau 5 : effet adjuvant de P40ext sur un antigène protéique

	Titre en anticorps anti-G2ΔC
BBG2ΔC	160
BBG2ΔC + adjuvant de Freund	2051200
extP40-BBG2ΔC	29800

15

BBG2ΔC est faiblement immunogène. L'utilisation d'adjuvant de Freund augmente le titre en anticorps anti-G2ΔC. Quand BBG2ΔC est conjugué par voie chimique à P40ext, la réponse anticorps anti-G2ΔC est augmentée d'environ 200 fois. P40ext est donc un bon adjuvant pour un antigène protéique.

20

4. Activité adjuvante des fragments de P40

25

On a injecté par voie sous-cutanée à des souris BALB/c (5 par groupe) au jour 0 et stimulé au jour 21 par les protéines recombinantes suivantes : la protéine de fusion BBP40G2ΔC, la protéine de fusion contenant le fragment de P40 n° 8 (BB8G2ΔC), la protéine de fusion contenant le fragment de P40 n° 16 (BB16G2ΔC) et la protéine de fusion contenant le fragment de P40 n° 18 (BB18G2ΔC) (10 μg équivalent G2 ΔC).

30

Au jour 31, les réponses anticorps anti-G2ΔC, anti-P40 et anti-BB sont déterminées par ELISA dans les sérums individuels. La moyenne des titres de 5 sérums individuels est effectuée. Les contrôles négatifs ne contenaient pas d'anticorps anti-G2ΔC.

5

Tableau 6 : effet adjuvant des fragments recombinants de P40

	TITRE EN ANTI CORPS ANTI-G2ΔC	TITRE EN ANTI CORPS ANTI-BB	TITRE EN ANTI CORPS ANTI-P40
BBP40G2ΔC	14 800	266 240	450 506
BB8G2ΔC	7 400	430 080	56 640
BB16G2ΔC	1 800	84 480	880
BB18G2ΔC	1 360	184 320	240

10

15

Dans cette expérience, on montre que les fragments de P40 conservent les propriétés de la protéine entière. Ceci est particulièrement spectaculaire lorsqu'on examine la réponse anticorps anti-BB.

La réponse anticorps anti-P40 est considérablement réduite en utilisant les fragments de P40.

20

25

30

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: PIERRE FABRE MEDICAMENTS
 (B) RUE: 45, PLACE ABEL GANCE
 (C) VILLE: BOULOGNE
 (E) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL: 92654

(ii) TITRE DE L' INVENTION: PROTEINE P40

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 8

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1008 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 1..1008

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GCT CCG AAA GAT AAC ACC TGG TAT GCA GGT GGT AAA CTG GGT TGG TCC	48
Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser	
1 5 10 15	
CAG TAT CAC GAC ACC GGT TTC TAC GGT AAC GGT TTC CAG AAC AAC AAC	96
Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn	
20 25 30	
GGT CCG ACC CGT AAC GAT CAG CTT GGT GCT GGT GCG TTC GGT GGT TAC	144
Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr	
35 40 45	
CAG GTT AAC CCG TAC CTC GGT TTC GAA ATG GGT TAT GAC TGG CTG GGC	192
Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly	
50 55 60	
CGT ATG GCA TAT AAA GGC AGC GTT GAC AAC GGT GCT TTC AAA GCT CAG	240
Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln	
65 70 75 80	

GGC GTT CAG CTG ACC GCT AAA CTG GGT TAC CCG ATC ACT GAC GAT CTG Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys Leu Gly Tyr Pro Il Thr Asp Asp Leu 85 90 95	288
GAC ATC TAC ACC CGT CTG GGC GGC ATG GTT TGG CGC GCT GAC TCC AAA Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys 100 105 110	336
GGC AAC TAC GCT TCT ACC GGC GTT TCC CGT AGC GAA CAC GAC ACT GGC Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly 115 120 125	384
GTT TCC CCA GTA TTT GCT GGC GGC GTA GAG TGG GCT GTT ACT CGT GAC Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp 130 135 140	432
ATC GCT ACC CGT CTG GAA TAC CAG TGG GTT AAC AAC ATC GGC GAC GCG Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala 145 150 155 160	480
GGC ACT GTG GGT ACC CGT CCT GAT AAC GGC ATG CTG AGC CTG GGC GTT Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val 165 170 175	528
TCC TAC CGC TTC GGT CAG GAA GAT GCT GCA CCG GTT GTT GCT CCG GCT Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Glu Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala 180 185 190	576
CCG GCT CCG GCT CCG GAA GTG GCT ACC AAG CAC TTC ACC CTG AAG TCT Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser 195 200 205	624
GAC GTT CTG TTC AAC TTC AAC AAA GCT ACC CTG AAA CCG GAA GGT CAG Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln 210 215 220	672
CAG GCT CTG GAT CAG CTG TAC ACT CAG CTG AGC AAC ATG GAT CCG AAA Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr Thr Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys 225 230 235 240	720
GAC GGT TCC GCT GTT GTT CTG GGC TAC ACC GAC CGC ATC GGT TCC GAA Asp Gly Ser Ala Val Val Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Gly Ser Glu 245 250 255	768
GCT TAC AAC CAG CAG CTG TCT GAG AAA CGT GCT CAG TCC GTT GTT GAC Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp 260 265 270	816
TAC CTG GTT GCT AAA GGC ATC CCG GCT GGC AAA ATC TCC GCT CGC GGC Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly 275 280 285	864
ATG GGT GAA TCC AAC CCG GTT ACT GGC AAC ACC TGT GAC AAC GTG AAA Met Gly Glu Ser Asn Pro Val Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys 290 295 300	912
GCT CGC GCT GCC CTG ATC GAT TGC CTG GCT CCG GAT CGT CGT GTA GAG Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu 305 310 315 320	960

ATC GAA GTT AAA GGC TAC AAA GAA GTT GTA ACT CAG CCG GCG GGT TA
 Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly
 325 330 335

1008

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 335 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser
 1 5 10 15
 Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn
 20 25 30
 Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr
 35 40 45
 Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly
 50 55 60
 Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln
 65 70 75 80
 Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu
 85 90 95
 Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys
 100 105 110
 Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly
 115 120 125
 Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp
 130 135 140
 Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala
 145 150 155 160
 Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val
 165 170 175
 Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Glu Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala
 180 185 190
 Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser
 195 200 205
 Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln
 210 215 220
 Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr Thr Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys
 225 230 235 240

Asp	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Leu	Gly	Tyr	Thr	Asp	Arg	Ile	Gly	Ser	Glu
				245					250					255	
Ala	Tyr	Asn	Gln	Leu	Ser	Glu	Lys	Arg	Ala	Gln	Ser	Val	Val	Asp	
			260				265					270			
Tyr	Leu	Val	Ala	Lys	Gly	Ile	Pro	Ala	Gly	Lys	Ile	Ser	Ala	Arg	Gly
		275					280					285			
Met	Gly	Glu	Ser	Asn	Pro	Val	Thr	Gly	Asn	Thr	Cys	Asp	Asn	Val	Lys
	290					295					300				
Ala	Arg	Ala	Ala	Leu	Ile	Asp	Cys	Leu	Ala	Pro	Asp	Arg	Arg	Val	Glu
305					310					315					320
Ile	Glu	Val	Lys	Gly	Tyr	Lys	Glu	Val	Val	Thr	Gln	Pro	Ala	Gly	
				325					330					335	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 537 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 1..537

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GCT	CCG	AAA	GAT	AAC	ACC	TGG	TAT	GCA	GGT	GGT	AAA	CTG	GGT	TGG	TCC	48
Ala	Pro	Lys	Asp	Asn	Thr	Trp	Tyr	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Gly	Trp	Ser	
1				5					10					15		
CAG	TAT	CAC	GAC	ACC	GGT	TTC	TAC	GGT	AAC	GGT	TTC	CAG	AAC	AAC	AAC	96
Gln	Tyr	His	Asp	Thr	Gly	Phe	Tyr	Gly	Asn	Gly	Phe	Gln	Asn	Asn	Asn	
			20					25					30			
GGT	CCG	ACC	CGT	AAC	GAT	CAG	CTT	GGT	GCT	GGT	GCG	TTC	GGT	GGT	TAC	144
Gly	Pro	Thr	Arg	Asn	Asp	Gln	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Tyr	
		35					40					45				
CAG	GTT	AAC	CCG	TAC	CTC	GGT	TTC	GAA	ATG	GGT	TAT	GAC	TGG	CTG	GGC	192
Gln	Val	Asn	Pro	Tyr	Leu	Gly	Phe	Glu	Met	Gly	Tyr	Asp	Trp	Leu	Gly	
	50					55					60					
CGT	ATG	GCA	TAT	AAA	GGC	AGC	GTT	GAC	AAC	GGT	GCT	TTC	AAA	GCT	CAG	240
Arg	Met	Ala	Tyr	Lys	Gly	Ser	Val	Asp	Asn	Gly	Ala	Phe	Lys	Ala	Gln	
65					70					75					80	
GGC	GTT	CAG	CTG	ACC	GCT	AAA	CTG	GGT	TAC	CCG	ATC	ACT	GAC	GAT	CTG	288
Gly	Val	Gln	Leu	Thr	Ala	Lys	Leu	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Asp	Asp	Leu	
				85					90					95		

GAC ATC TAC ACC CGT CTG GGC GGC ATG GTT TGG CGC GCT GAC TCC AAA Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys	336
100 105 110	
GGC AAC TAC GCT TCT ACC GGC GTT TCC CGT AGC GAA CAC GAC ACT GGC Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly	384
115 120 125	
GTT TCC CCA GTA TTT GCT GGC GGC GTA GAG TGG GCT GTT ACT CGT GAC Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp	432
130 135 140	
ATC GCT ACC CGT CTG GAA TAC CAG TGG GTT AAC AAC ATC GGC GAC GCG Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala	480
145 150 155 160	
GGC ACT GTG GGT ACC CGT CCT GAT AAC GGC ATG CTG AGC CTG GGC GTT Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val	528
165 170 175	
TCC TAC CGC Ser Tyr Arg	537

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 179 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser	
1 5 10 15	
Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn	
20 25 30	
Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr	
35 40 45	
Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly	
50 55 60	
Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln	
65 70 75 80	
Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu	
85 90 95	
Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys	
100 105 110	
Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly	
115 120 125	
Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp	
130 135 140	

Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala
145 150 155 160

Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val
165 170 175

Ser Tyr Arg

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 216 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 1..216

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CGC	GCT	GAC	TCC	AAA	GGC	AAC	TAC	GCT	TCT	ACC	GGC	GTT	TCC	CGT	AGC	48
Arg	Ala	Asp	Ser	Lys	Gly	Asn	Tyr	Ala	Ser	Thr	Gly	Val	Ser	Arg	Ser	
1				5				10					15			
GAA	CAC	GAC	ACT	GGC	GTT	TCC	CCA	GTA	TTT	GCT	GGC	GGC	GTA	GAG	TGG	96
Glu	His	Asp	Thr	Gly	Val	Ser	Pro	Val	Phe	Ala	Gly	Gly	Val	Glu	Trp	
			20				25						30			
GCT	GTT	ACT	CGT	GAC	ATC	GCT	ACC	CGT	CTG	GAA	TAC	CAG	TGG	GTT	AAC	144
Ala	Val	Thr	Arg	Asp	Ile	Ala	Thr	Arg	Leu	Glu	Tyr	Gln	Trp	Val	Asn	
			35			40						45				
AAC	ATC	GGC	GAC	GCG	GGC	ACT	GTG	GGT	ACC	CGT	CCT	GAT	AAC	GGC	ATG	192
Asn	Ile	Gly	Asp	Ala	Gly	Thr	Val	Gly	Thr	Arg	Pro	Asp	Asn	Gly	Met	
	50					55				60						
CTG	AGC	CTG	GGC	GTT	TCC	TAC	CGC									216
Leu	Ser	Leu	Gly	Val	Ser	Tyr	Arg									
65						70										

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 72 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly Val Ser Arg Ser
1 5 10 15

28

Glu His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp
 20 25 30
 Ala Val Thr Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn
 35 40 45
 Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met
 50 55 60
 Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg
 65 70

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 159 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1..159

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

ACT GGC GTT TCC CCA GTA TTT GCT GGC GGC GTA GAG TGG GCT GTT ACT	48
Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp Ala Val Thr	
1 5 10 15	
CGT GAC ATC GCT ACC CGT CTG GAA TAC CAG TGG GTT AAC AAC ATC GGC	96
Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly	
20 25 30	
GAC GCG GGC ACT GTG GGT ACC CGT CCT GAT AAC GGC ATG CTG AGC CTG	144
Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu	
35 40 45	
GGC GTT TCC TAC CGC	159
Gly Val Ser Tyr Arg	
50	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 53 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp Ala Val Thr
 1 5 10 15

Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly
20 25 30

Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu
35 40 45

Gly Val Ser Tyr Arg
50

REVENDICATIONS

1. Produit adjuvant destiné à améliorer l'activité d'une molécule lors de l'administration à un hôte, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une partie de la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae* ou une protéine présentant au moins 90% d'homologie avec la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae*.

2. Produit adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une protéine présentant la séquence ID n° 2 ou présentant au moins 90% d'homologie avec cette séquence.

3. Produit adjuvant selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence comprise entre les amino-acides 1 à 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae*, ou une séquence présentant au moins 90% d'homologie avec la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 1 et 179 de la séquence de la protéine P40 de *K. pneumoniae*.

4. Produit adjuvant selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence comprise entre les amino-acides 108 à 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae* ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 108 et 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae*.

5. Produit adjuvant selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 127 à 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae* ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 127 à 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae*.

6. Protéine ou peptide présentant l'une des séquences ID n° 2, ID n° 4, ID n° 6 ou ID n° 8.

7. Séquence d'ADN codant pour un produit selon l'une des revendications 1 à 6.

8. Complexe immunogène du type comprenant un élément immunogène, associé à un adjuvant augmentant l'intensité de la réponse immunitaire, caractérisé en ce que l'élément immunogène est un antigène ou un haptène, et l'adjuvant comprend un produit selon l'une des revendications 1 à 6.

9. Complexe immunogène selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'élément immunogène est associé à l'adjuvant par une liaison covalente.

5 10. Complexe immunogène selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que l'élément immunogène est constitué d'un fragment de la protéine G du RSV.

10 11. Complexe immunogène selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que l'élément immunogène, associé à l'adjuvant, est fusionné avec une protéine qui est un récepteur à une protéine sérique, en particulier à la sérumalbumine humaine.

12. Procédé pour augmenter l'immunogénicité d'un antigène ou d'un haptène, caractérisé en ce qu'on associe ledit antigène ou haptène à un adjuvant selon l'une des revendications 1 à 6, sous forme d'un complexe selon l'une des revendications 8 à 11.

15 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'on associe l'antigène ou l'haptène à l'adjuvant par couplage chimique.

14. Procédé selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce que l'antigène ou l'haptène est fusionné par génie génétique à l'adjuvant.

20 15. Vaccin caractérisé en ce qu'il contient un complexe selon l'une des revendications 8 à 11, susceptible d'être préparé par le procédé selon l'une des revendications 12 à 14.

16. A titre de médicament, séquence d'ADN selon la revendication 7.

25 17. Utilisation d'une séquence d'ADN selon la revendication 7 pour la préparation d'un vaccin utile par voie intramusculaire ou intradermale.

18. Procédé de préparation d'un produit adjuvant selon l'une des revendications 1 à 6, à partir de membranes de bactéries du genre *Klebsiella pneumoniae*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

- 30 a) précipitation des lipopolysaccharides par addition de détergent et d'un sel de cation divalent et récupération du surnageant,
b) précipitation des protéines du surnageant et remise en suspension du culot,

- c) chromatographie de la suspension sur échangeur d'anions et récupération des fractions contenant le produit adjuvant,
- d) chromatographie sur échangeur de cations et récupération de la fraction contenant le produit adjuvant,
- 5 e) concentration de la fraction obtenue à l'issue de l'étape d) pour récupérer un produit adjuvant sous forme de protéine, essentiellement dépourvu de liposaccharides.

☒ Séquence publiée
☐ Séquence à déterminer

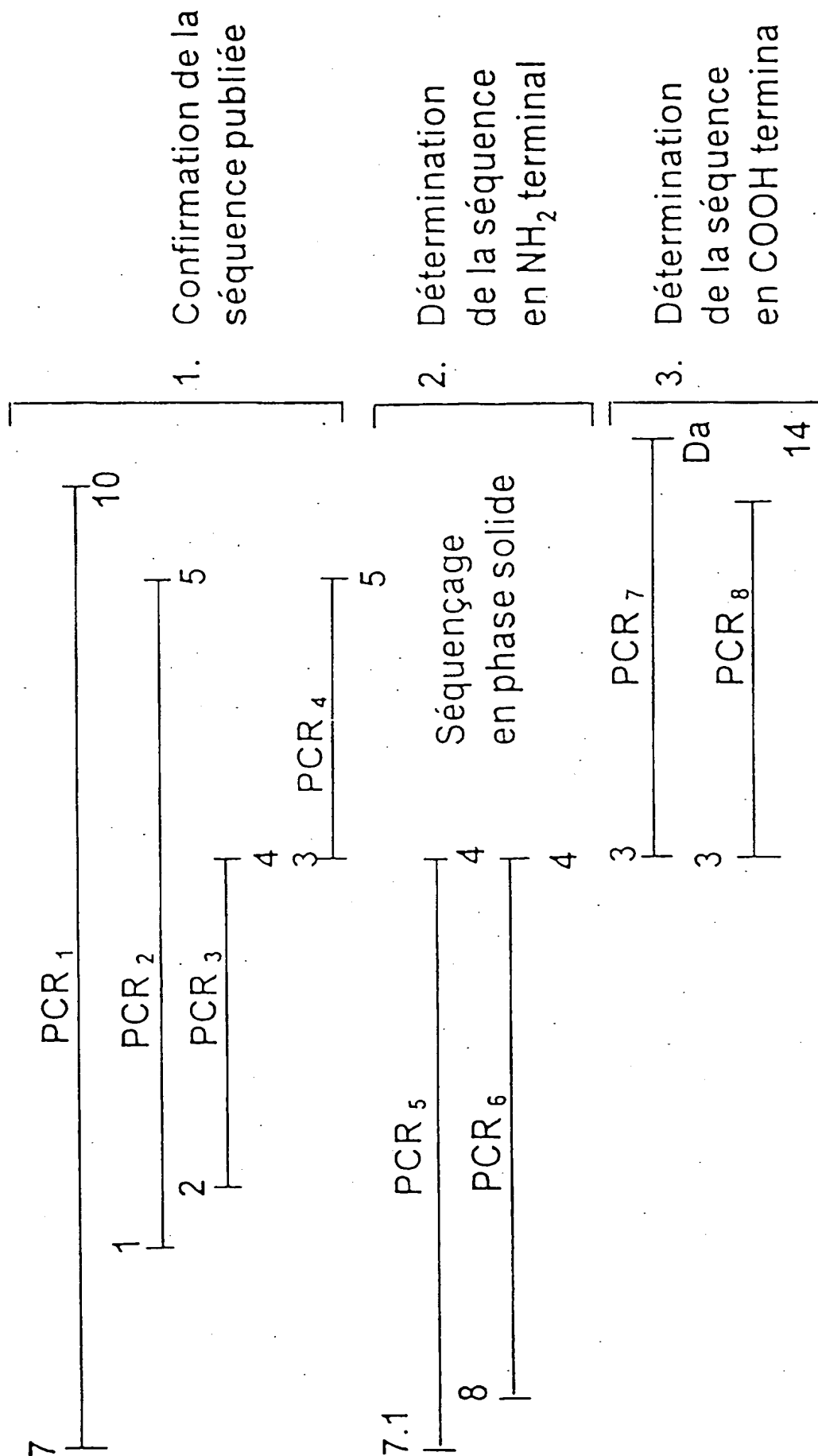


FIGURE 1

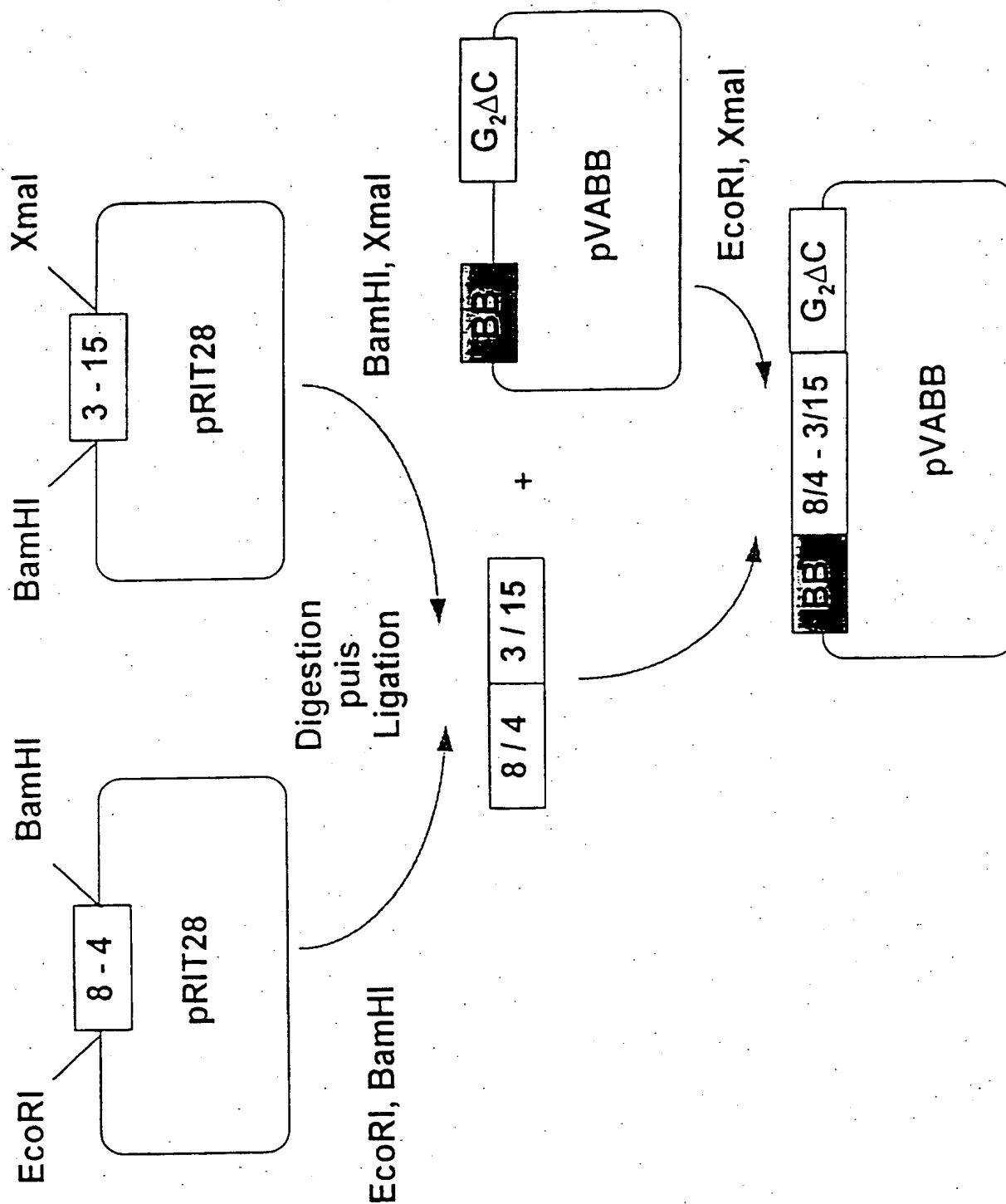


FIGURE 2

3/6

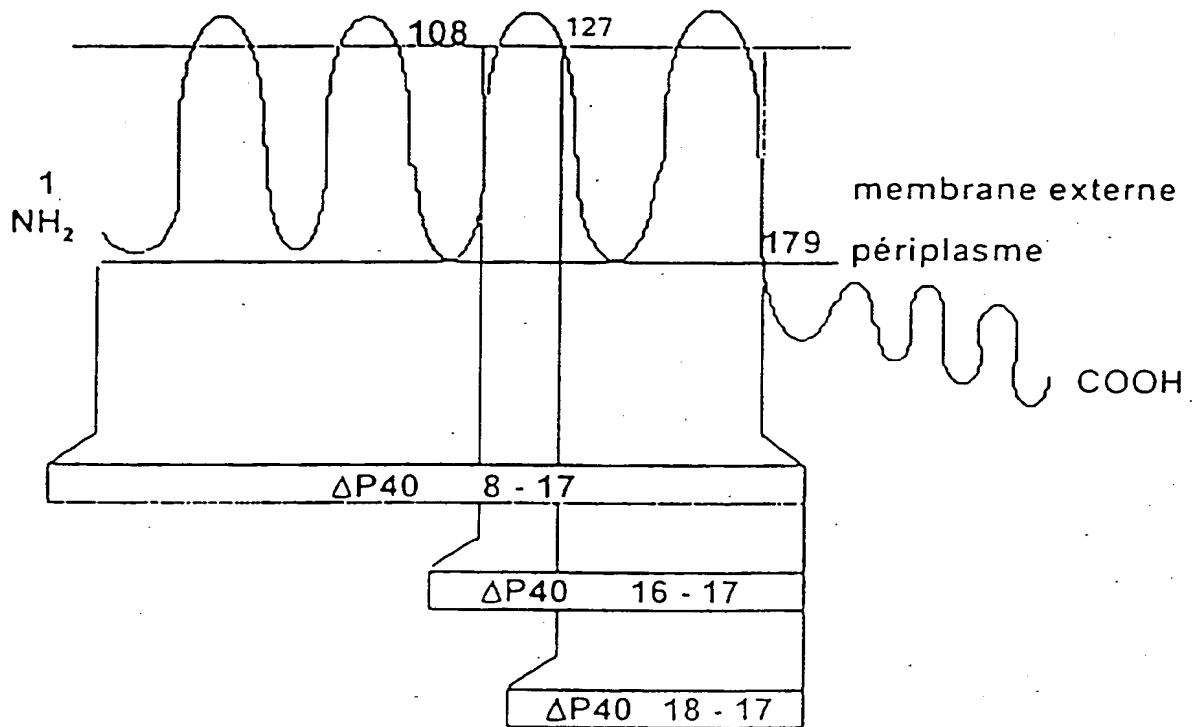


FIGURE 3

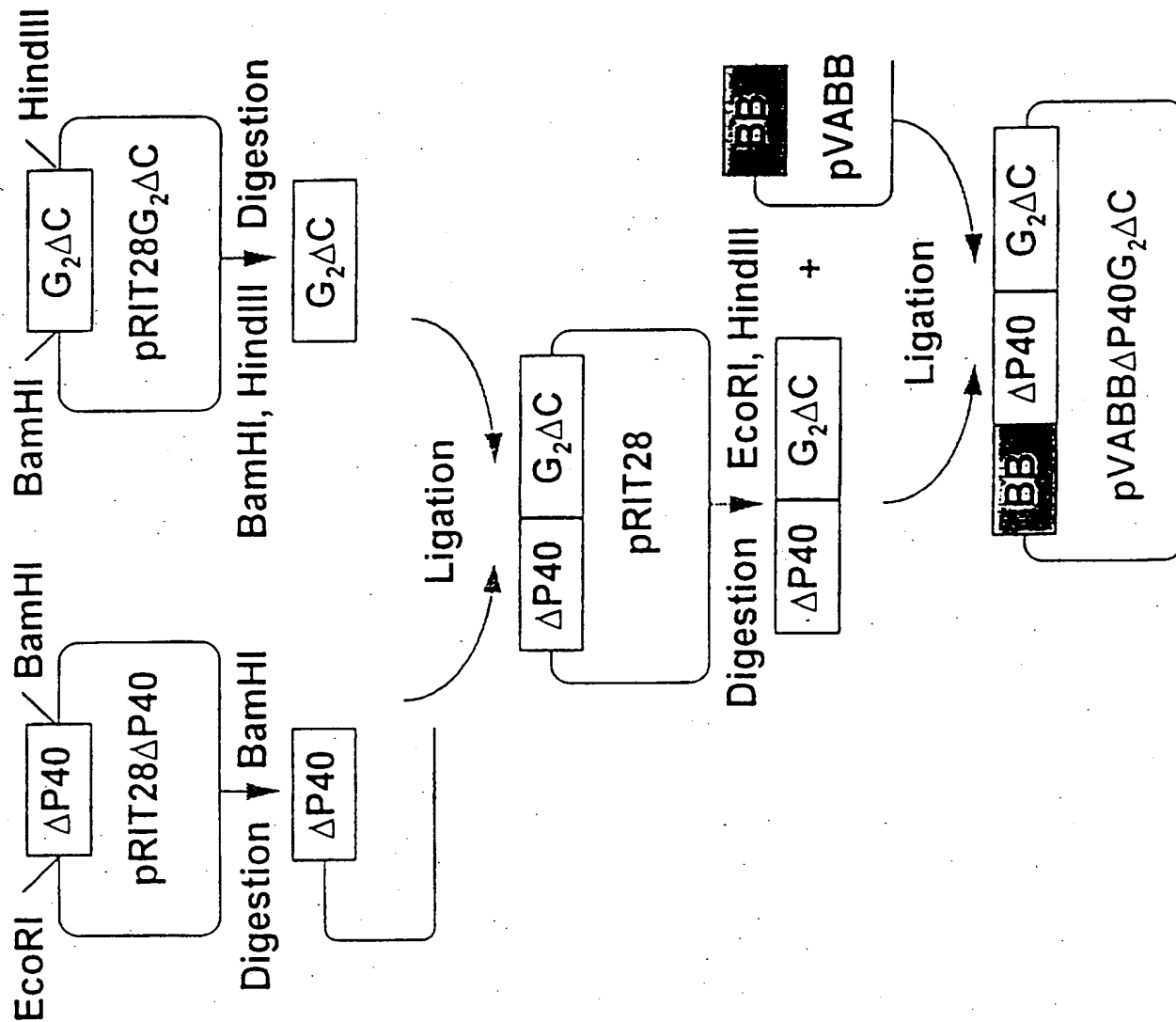


FIGURE 4

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

5/6

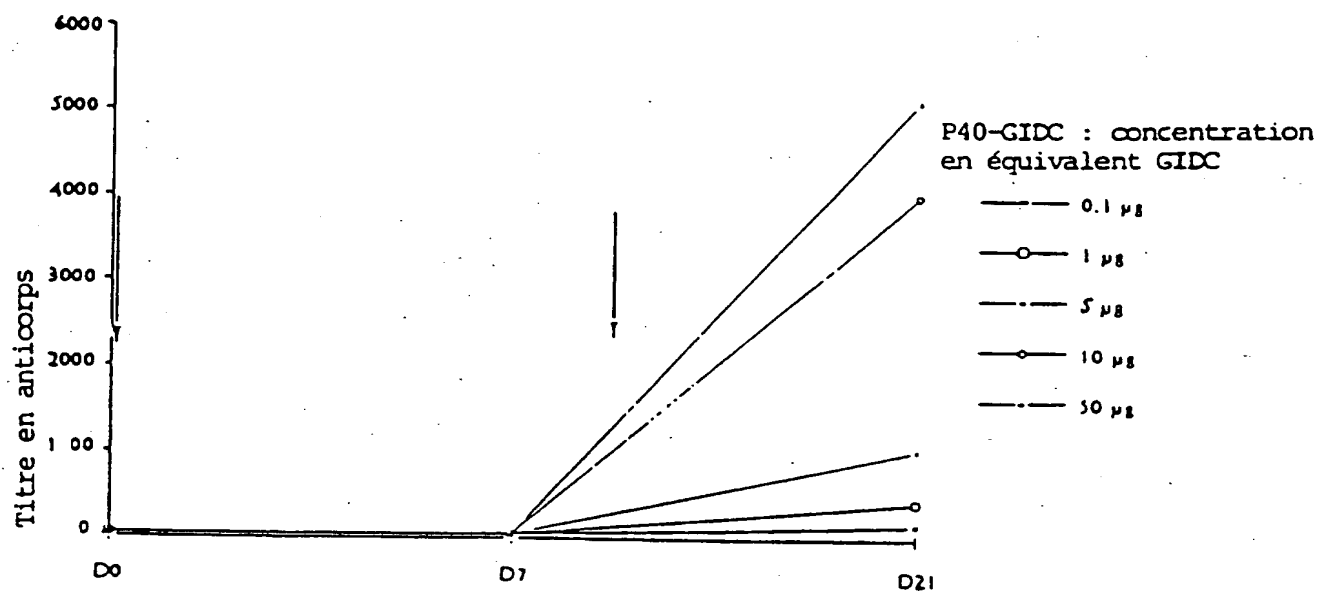


FIGURE 5

6/6

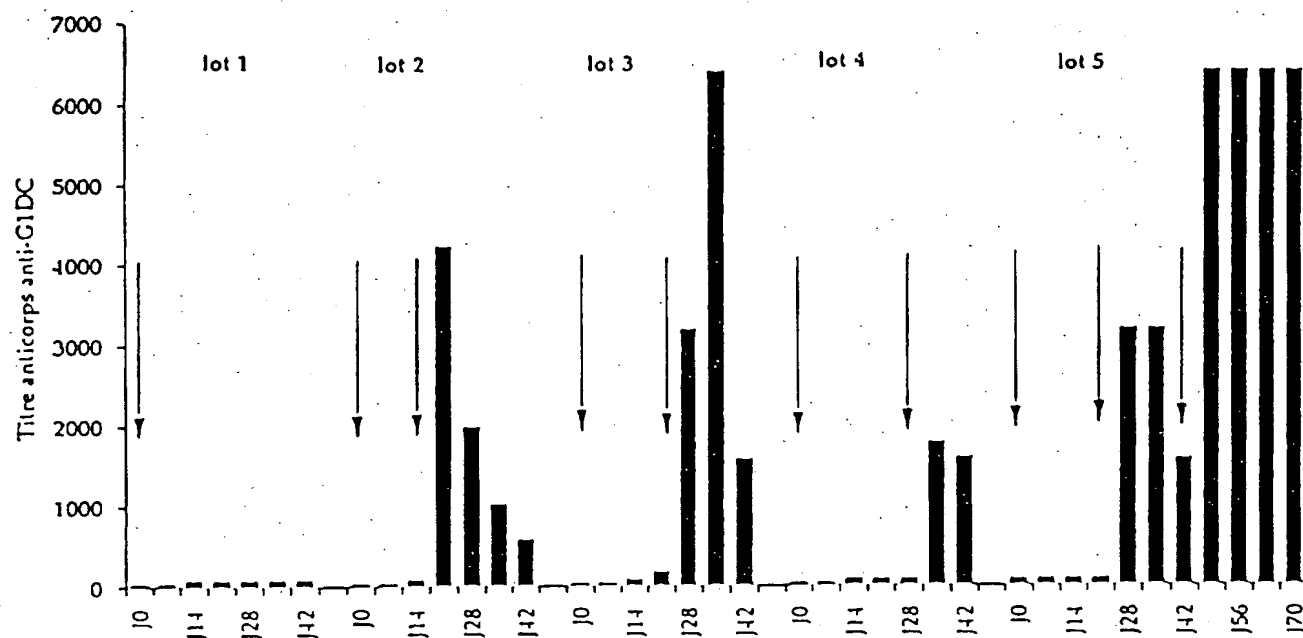


FIGURE 6

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No
PCT/FR 95/01463

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/31 C07K14/26 A61K39/108 A61K39/155 A61K39/385
A61K31/715

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, vol. 137, no. 8, pages 1911-1921, LAWRENCE J.G. ET AL. 'Molecular and evolutionary relationships among enteric bacteria'	7
Y	see the whole document ---	1,8-15
Y	WO,A,89 05823 (THE UPJOHN COMPANY) 29 June 1989 see the whole document ---	1,8-15
Y	WO,A,92 04375 (THE UPJOHN COMPANY) 19 March 1992 see page 16 - page 17 --- -/-	8-15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 February 1996

Date of mailing of the international search report

25.03.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No

PCT/FR 95/01463

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,93 14207 (CONNAUGHT LABORATORIES LIMITED) 22 July 1993 see page 36 - page 41 ---	8-15
P,X	WO,A,95 27787 (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 19 October 1995 see the whole document -----	1-18

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Application No
PCT/FR 95/01463

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO-A-8905823	29-06-89	AU-B-	2785089	19-07-89
		CA-A-	1320163	13-07-93
		DE-A-	3878468	25-03-93
		EP-A,B	0396563	14-11-90
		HK-A-	166295	03-11-95
		JP-T-	3501723	18-04-91
		US-A-	5194595	16-03-93
		US-A-	5288630	22-02-94

WO-A-9204375	19-03-92	AT-T-	107661	15-07-94
		AU-B-	8298291	30-03-92
		CA-A-	2087003	01-03-92
		DE-D-	69102649	28-07-94
		DE-T-	69102649	03-11-94
		EP-A-	0545951	16-06-93
		ES-T-	2055610	16-08-94
		JP-T-	6500536	20-01-94

WO-A-9314207	22-07-93	AU-B-	3340293	03-08-93
		CA-A-	2126863	22-07-93
		EP-A-	0621898	02-11-94
		FI-A-	943211	02-09-94
		JP-T-	7501707	23-02-95
		NO-A-	942530	05-09-94

WO-A-9527787	19-10-95	FR-A-	2718452	13-10-95
		AU-B-	2310995	30-10-95

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Internationale No
PCT/FR 95/01463

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 CIB 6 C12N15/31 C07K14/26 A61K39/108 A61K39/155 A61K39/385
 A61K31/715

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K A61K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, vol. 137, no. 8, pages 1911-1921, LAWRENCE J.G. ET AL. 'Molecular and evolutionary relationships among enteric bacteria'	7
Y	voir le document en entier ---	1,8-15
Y	WO,A,89 05823 (THE UPJOHN COMPANY) 29 Juin 1989 voir le document en entier ---	1,8-15
Y	WO,A,92 04375 (THE UPJOHN COMPANY) 19 Mars 1992 voir page 16 - page 17 ---	8-15
	--- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 Février 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25 03.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreau, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche Internationale No
PCT/FR 95/01463

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO,A,93 14207 (CONNAUGHT LABORATORIES LIMITED) 22 Juillet 1993 voir page 36 - page 41 ---	8-15
P,X	WO,A,95 27787 (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 19 Octobre 1995 voir le document en entier -----	1-18

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Internationale No
PCT/FR 95/01463

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-8905823	29-06-89	AU-B- 2785089	19-07-89
		CA-A- 1320163	13-07-93
		DE-A- 3878468	25-03-93
		EP-A,B 0396563	14-11-90
		HK-A- 166295	03-11-95
		JP-T- 3501723	18-04-91
		US-A- 5194595	16-03-93
		US-A- 5288630	22-02-94
WO-A-9204375	19-03-92	AT-T- 107661	15-07-94
		AU-B- 8298291	30-03-92
		CA-A- 2087003	01-03-92
		DE-D- 69102649	28-07-94
		DE-T- 69102649	03-11-94
		EP-A- 0545951	16-06-93
		ES-T- 2055610	16-08-94
		JP-T- 6500536	20-01-94
WO-A-9314207	22-07-93	AU-B- 3340293	03-08-93
		CA-A- 2126863	22-07-93
		EP-A- 0621898	02-11-94
		FI-A- 943211	02-09-94
		JP-T- 7501707	23-02-95
		NO-A- 942530	05-09-94
WO-A-9527787	19-10-95	FR-A- 2718452	13-10-95
		AU-B- 2310995	30-10-95